昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*, June 2007, 50(6):574－577 ISSN 0454-6296

细辛醚对粘虫幼虫的毒力及几种重要酶系的影响

张 静,冯 岗,马志卿,冯俊涛*,张 兴

(西北农林科技大学无公害农药研究服务中心/陕西省生物农药工程技术研究中心,陕西杨凌 712100)

摘要:采用点滴法测定了细辛醚对粘虫 *Mythimna separata* Walker 5 龄幼虫的触杀毒力,观察了细辛醚对粘虫的致毒症状,并测定了对不同中毒阶段其头部或中肠乙酰胆碱酯酶(AChE)和腺苷三磷酸酶(ATPase)离体活性以及乙酰胆碱(ACh)含量的影响。结果表明:细辛醚对粘虫 5 龄幼虫 12 h 的触杀 LD_{50} 值为 106.93 μg/头;中毒粘虫依次表现出兴奋、痉挛、麻痹和死亡等症状,类似于神经毒剂的致毒症状,但试虫从中毒到死亡历期较长,且中毒试虫肠内有气泡产生,此现象异于典型的神经毒剂;对 Na^+,K^+-ATPase 有较强的抑制作用,在兴奋期、痉挛期和麻痹期,酶抑制率分别为 33.29%、44.45%和 23.98%;对 AChE 活力在不同阶段的抑制率分别是 21.64%、29.75%和 35.22%;ACh 含量有所增加。

关键词:粘虫;细辛醚;钠、钾腺苷三磷酸酶;乙酰胆碱酯酶;乙酰胆碱;酶活性

中图分类号:Q965.9 **文献标识码**:A **文章编号**:0454-6296(2007)06-0574-04

Toxicity of sarisan against *Mythimna separata* Walker and its effects on AChE and ATPases

ZHANG Jing, FENG Gang, MA Zhi-Qing, FENG Jun-Tao*, ZHANG Xing (Research and Development Center of Biorational Pesticide/ Shannxi Research Center of Biopesticide Engineering and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The contact toxicity of sarisan against 5th instar larvae of *Mythimna separata* Walker was tested under the laboratory conditions with the method of topical application, their toxicity symptoms were observed, and its effects on the *in vitro* activities of AChE and ATPase and the content of ACh in heads or midguts of the larvae in different stages of toxicity were assayed. The results showed that the contact toxicity LD_{50} value of sarisan against the 5th instar larvae of *M*. *separata* in 12 h post treatment was 106.93 μg/larva. *In vivo* toxicity symptoms were characterized by a definite sequence of events, starting with excitation, convulsion, paralysis, and death. Hollow duodenum was found in *M*. *separata*. AChE and Na^+, K^+-ATPase in *M*. *separata* larvae were strongly inhibited by sarisan, and a higher ACh content was caused by sarisan. During excitation, convulsion and paralysis of treated larvae, the inhibition rates of AChE were 21.64%, 29.75% and 35.22%, respectively, while the inhibition rates of Na^+, K^+-ATPase were 33.29%, 44.45% and 23.98%, respectively.

Key words: *Mythimna separata*; sarisan; Na^+, K^+-ATPase; AChE; ACh; enzyme activity

细辛醚(sarisan/asaricin)是存在于多种植物精油中的一个甲撑二氧苯基类化合物(陈蕙芳, 2001)。目前,国外对该化合物的报道较少,主要报道的是成分分离、结构鉴定及抑菌活性的初步筛选和测定(Haerdi, 1964; Villegas *et al*., 1988; Masuda *et al*., 1991; Bizzo *et al*., 2001)。万传星(2003)从伞形科藁本属植物藁本 *Ligusticum sinense* Oliv. 中分离得到细辛醚,并发现该化合物对粘虫 *Mythimna separata*、小菜蛾 *Pieris rapae* 和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 卵表现出一定的毒杀作用。张静(2005)研究发现该化合物还对家蝇 *Musca domestica*、淡色库蚊 *Culex pipiens pallens*、玉米象 *Sitophilus zeamais* 和桃蚜 *Myzus persicae* 等多种害虫有较高的熏蒸和触杀作用。为进一步明确细辛醚的杀虫活性及杀虫作用机理,作

基金项目:国家'十五'攻关重大专项(2002BA516A04);西北农林科技大学校科研专项(30471156)

作者简介:张静,女,1981 年生,博士研究生,主要从事药剂毒理学研究,E-mail:jing99gj@sina.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail:JTFeng@126.com

收稿日期 Received:2006-11-13;接受日期 Accepted:2007-04-16

者测定了该化合物对粘虫的触杀活性和致毒症状，及其对试虫体内重要的酶系钠、钾腺苷三磷酸酶（Na^+，K^+-ATPase）和乙酰胆碱酯酶（AChE）活性（活体、离体）以及乙酰胆碱（ACh）含量的影响。

1　材料与方法

1.1　供试药剂

细辛醚：从藁本中分离制备所得，纯度在 95% 以上，由西北农林科技大学无公害农药研究中心提供。硫代乙酰胆碱（ASch）、谷胱甘肽、DTNB、ATP 二钠盐、α-醋酸萘酯、固蓝 B 盐、盐酸羟胺、溴化乙酰胆碱等均为美国 Sigma 公司产品；其他试剂均为分析纯产品。

1.2　供试昆虫

粘虫 5 龄幼虫，在室内（25 ± 2）℃、相对湿度 65% ~ 80%、光周期 12L∶12D 条件下饲养，由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供。

1.3　方法

1.3.1　触杀毒力测定方法：采用点滴法（张静，2005）测定细辛醚对粘虫 5 龄幼虫的触杀毒力。每处理重复 3 次，每重复 15 头试虫，对照点滴等量丙酮。点滴处理后将试虫置于养虫室中饲养，同时观察并记录其症状。12 h 后调查死亡虫数，计算校正死亡率。以机率值分析法求出毒力曲线及致死中量（LD_{50}）。

1.3.2　AChE 活性（活体）测定：以触杀 LD_{90} 剂量的细辛醚点滴处理粘虫 5 龄幼虫，于兴奋期、痉挛期和麻痹期分别取 20 头试虫于低温冰箱中冷冻备用。剪取试虫头壳，按 1∶10（W/V）加入 0.2 mol/L 的 PBS 于冰浴中匀浆，在冷冻离心机中于 4 000 r/min 离心 15 min，上清液即为待测酶液。酶活性测定方法参照 Ellman（1961）。

1.3.3　AChE 活性（离体）测定：剪取 50 头 5 龄幼虫的头壳，按 1∶10（W/V）加入 0.2 mol/L 的 PBS 于冰浴中匀浆，在冷冻离心机中于 4 000 r/min 离心 15 min，上清液即为待测酶液。酶活性测定方法参照 Ellman（1961）。

1.3.4　Na^+，K^+-ATPase 活性测定：试虫处理同 AChE 活力测定。分别取试虫头部（50 个）和中肠（20 条），按 1∶10（W/V）加入冰冷的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液，冰浴匀浆，在冷冻离心机中于 4 000 r/min 离心 10 min，上清液即为待测酶液。酶活性测定方法参照 Duggan 和 Noll（1965）。

1.3.5　ACh 含量测定：试虫处理同 AChE 活力测定。以 0.1 mL/头的量加入 0.067 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液，于冰浴中迅速匀浆后，将匀浆液平分为 A、B 两管，在 A 管按 0.05 mL/mL 匀浆液的量加入 0.06 mol/L 的敌百虫，混匀后于 100℃ 水浴中加热 2 min。B 管中同样以 0.05 mL/mL 的比例加入缓冲液，置于 37℃ 水浴保温 20 min 后，再在 100℃ 水浴中加热 2 min。A、B 两管的匀浆液分别在 4 000 r/min 离心 10 min，取上清液 1.0 mL，以羟胺法（Turner，1977）测定 ACh 的含量。

1.3.6　蛋白含量测定：参照 Bradford（1976）的考马斯亮蓝法。

2　结果与分析

2.1　毒力测定结果

采用微量点滴法测定了细辛醚对粘虫 5 龄幼虫的触杀毒力。结果表明，该化合物对粘虫具有明显的触杀活性，其毒力方程为：$Y = -6.09 + 5.47X$，LD_{50} 值为 106.93 μg/头。

2.2　致毒症状

利用上述触杀毒力方程求得 LD_{90}，以此剂量点滴处理粘虫 5 龄幼虫，观察试虫中毒症状。观察发现，处理后 15 min 左右，粘虫表现兴奋症状，快速爬动，头胸部高高抬起，左右摆动或长时间保持抬胸状，继而头勾向胸部，胸部拱起，口器持续一张一合，或以口器磨擦胸足和滤纸，连续反吐少量胃液；40 min 后大部分试虫运动减少，体躯前后抽搐，同时继续大量反吐胃液，部分试虫无法正常排便，在此阶段可观察到半数以上试虫胸部出现半透明段，并随时间的增加而增长，最长可至整个体躯长的一半以上；2 h 后，处理试虫多爬行不稳，体躯扭曲翻滚，足、口器震颤，表现为强烈的痉挛症状，5 ~ 6 h 后转为轻度痉挛，痉挛期可持续 10 h 以上，该阶段试虫体内半透明段不断增长，观察到最长可至约 3/5 体长；约 8 h 后，部分试虫体躯侧卧，口器、足及体躯微颤；12 h 后，大部分试虫死亡，死亡试虫多体躯瘫软，表皮皱缩，体色黯淡，呈侧卧或正常爬行状。

对出现半透明段的试虫进行解剖，发现试虫前肠及中肠前端均无食物，而是聚集大量大小不一的气泡或充满气体，随着痉挛时间的增加气泡聚集成气段且不断增长，延伸至中肠后端；而饥饿相同时间的对照试虫，在其前肠或中肠中无气泡；解剖正常取食的试虫发现仅有个别试虫前肠内有少数很小的

气泡。

2.3 细辛醚对粘虫 AChE 活体活性的影响

测定不同中毒时期细辛醚对粘虫 AChE 活力的影响，结果表明：细辛醚对粘虫 AChE 有一定的抑制作用。在兴奋期、痉挛期和麻痹期，抑制率随中毒程度的加深而增加，分别为 21.64%、29.75% 和 35.22%，与对照相比均存在显著差异(表1)。

表1 细辛醚对粘虫5龄幼虫 AChE 活性的影响

Table 1 Effect of sarisan on AChE activity in 5th instar larvae of *Mythimna separata*

中毒阶段 Stage of toxicity	酶比活力 Specific activity ($nmol \cdot mg^{-1} \cdot 20\ min^{-1}$)	抑制率(%) Inhibition rate
对照 CK	146.74 ± 6.13 aA	–
兴奋期 Excitation stage	118.36 ± 3.33 bB	21.64
痉挛期 Convulsion stage	103.09 ± 0.67 cC	29.75
麻痹期 Paralysis stage	95.06 ± 3.76 dC	35.22

注：表中数据为3次平均值，标准曲线：$Y = 0.0113 + 0.00106X$ ($r = 0.9996$)；蛋白标准曲线：$Y = -0.0918 + 1.366 * 10^{-3}\ X$ ($r = 0.9943$)；酶比活力一栏中，数据后标相同小(大)写字母者表示经Duncan氏新复极差检验，在 $P_{0.05}$($P_{0.01}$)水平上差异不显著，下表同。

Notes: Data given are from 3 duplications. The standard curve is $0.0113 + 0.00106X$ ($r = 0.9996$). The standard curve of protein is $Y = -0.0918 + 1.366 * 10^{-3}\ X$ ($r = 0.9943$). Data in a column followed by the same small/capital letters are not significantly different at $P_{0.05}/P_{0.01}$ level by multiple range test, respectively. The same below.

2.4 细辛醚对粘虫 AChE 离体活性的影响

测定了不同剂量细辛醚对粘虫 AChE 离体活性的影响。以细辛醚的剂量的对数为横坐标，以其对 AChE 活力的抑制率的机率值为纵坐标，得线性相关方程：$Y = 1.58 + 1.68X$，其 $I_{50} = 108.3\ \mu g \cdot mL^{-1}$，95%置信限为 79.16 ~ 148.05 $\mu g \cdot mL^{-1}$。可见，细辛醚对粘虫5龄幼虫体内的 AChE 活性具有较强的抑制作用。

2.5 细辛醚对粘虫头部 Na^+, K^+-ATPase 活性的影响

细辛醚对粘虫头部 Na^+, K^+-ATPase 活性影响见表2。由表2可知，细辛醚对粘虫体内 Na^+, K^+-ATPase 活性在兴奋期、痉挛期和麻痹期均有明显抑制作用，其中痉挛期最高，在麻痹期抑制率有所下降，抑制率分别为 33.29%、44.45% 和 23.98%。

表2 细辛醚对粘虫5龄幼虫头部 Na^+, K^+-ATP 酶的影响

Table 2 Effect of sarisan on Na^+, K^+-ATPase activity in heads of 5th instar larvae of *Mythimna separata*

中毒阶段 Stage of toxicity	酶比活力 Specific activity ($nmol \cdot mg^{-1} \cdot 20\ min^{-1}$)	抑制率(%) Inhibition rate
对照 CK	10.56 ± 0.012 aA	–
兴奋期 Excitation stage	7.04 ± 0.39 cC	33.29
痉挛期 Convulsion stage	5.86 ± 0.03 dD	44.45
麻痹期 Paralysis stage	8.02 ± 0.29 bB	23.98

注：标准曲线 $Y = -0.0224 + 0.0209X$ ($r = 0.9993$)。

Notes: The standard curve is $Y = -0.0224 + 0.0209X$ ($r = 0.9993$).

2.6 细辛醚对粘虫中肠 Na^+, K^+-ATPase 活性的影响

细辛醚对粘虫中肠 Na^+, K^+-ATPase 活性影响见表3。由表3可知，细辛醚对粘虫中肠 Na^+, K^+-ATPase 活性在兴奋期无明显抑制作用，但在痉挛期及麻痹期有一定的抑制作用。

表3 细辛醚对粘虫5龄幼虫中肠 Na^+, K^+-ATP 酶的影响

Table 3 Effect of sarisan on Na^+, K^+-ATPase activity in midguts of 5th instar larvae of *Mythimna separata*

中毒阶段 Stage of toxicity	酶比活力 Specific activity ($nmol \cdot mg^{-1} \cdot 20\ min^{-1}$)	抑制率(%) Inhibition rate
对照 CK	1.99 ± 0.04 aA	–
兴奋期 Excitation stage	1.88 ± 0.01 abAB	5.73
痉挛期 Convulsion stage	1.79 ± 0.07 bcAB	10.07
麻痹期 Paralysis stage	1.68 ± 0.07 cB	15.73

注：回归方程 $Y = -0.0224 + 0.0209X$ ($r = 0.9993$)。

Notes: The standard curve is $Y = -0.0224 + 0.0209X$ ($r = 0.9993$).

2.7 细辛醚对粘虫头部 ACh 含量的影响

测定结果(表4)表明，细辛醚处理对试虫神经组织中的 ACh 含量有一定的影响。在兴奋期，试虫 ACh 含量和对照相差不明显，而在痉挛期和麻痹期 ACh 含量明显高于对照。

表4 细辛醚对粘虫5龄幼虫头部 ACh 含量的影响

Table 4 Effect of sarisan on ACh content in heads of 5th instar larvae of *Mythimna separata*

中毒阶段 Stage of toxicity	ACh 含量 ($\mu mol \cdot mL^{-1}$)	比率 Ratio
对照 CK	0.46 ± 0.01 cC	1.00
兴奋期 Excitation stage	0.44 ± 0.01 cC	0.96
痉挛期 Convulsion stage	0.55 ± 0.03 bB	1.20
麻痹期 Paralysis stage	0.62 ± 0.01 aA	1.35

注：ASch 标准曲线：$Y = -0.00198 + 0.131X$ ($r = 0.999$)。

Notes: The standard curve of ASch is $Y = -0.00198 + 0.131X$ ($r = 0.999$).

3 讨论

3.1 细辛醚对粘虫的神经系统具有明显的抑制作用

目前开发的大多数杀虫剂作用于昆虫的神经系统，其作用靶标主要有 AChE、AChR、GABA 受体、章鱼胺受体等，如有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂主要作用于突触部位的神经冲动传导，对 AChE 产生抑制；沙蚕毒素类杀虫剂的作用机制是占领突触后膜的 AChR；阿维菌素的作用机制是作用于昆虫的 GABA 受体；甲脒类杀虫剂的作用机制是作用于章鱼胺受体，并且对轴突膜局部有麻醉作用。本实验结果表明，细辛醚对粘虫体内 AChE 具有较高的抑

制作用，离体 I_{50} 为 108.3 $\mu g \cdot mL^{-1}$，活体最高抑制率为 35.22%，与传统的 AChE 抑制剂相比（中毒期最高抑制率一般在 50%左右），抑制率较低（赵善欢，1993），但细辛醚同传统的 AChE 抑制剂一样，对 AChE 的抑制作用都是随中毒程度的加深而增强。且发现试虫头部 ACh 含量在痉挛期和麻痹期显著升高，与对照试虫的比率高达 1.35∶1。ACh 作为神经传递介质，其含量显著升高，势必影响甚至最终阻断神经冲动的传导。这说明细辛醚对试虫 AChE 活力的抑制及 ACh 含量的升高可能是导致试虫产生兴奋、痉挛，最终麻痹死亡的一个主要原因。

此外，细辛醚对粘虫头部 Na^+，K^+-ATPase 在兴奋期、痉挛期和麻痹期均有明显抑制作用，痉挛期抑制率高达 44.45%，对中肠 Na^+，K^+-ATPase 也有一定的抑制作用。Na^+，K^+-ATPase 被显著抑制可导致试虫体内 Na^+ 离子流受抑制，水被吸收，Ca^{2+} 滞留，引起各种谷氨酸盐及其他神经递质的释放，于是机体会迅速出现反应，因而昆虫能在很短的时间内表现出神经性的中毒症状（Lees，1991；赵善欢，1993）。细辛醚处理的试虫中毒症状出现很快，有兴奋、痉挛、昏迷等典型神经毒剂所引发的症状反应，进一步表明细辛醚作用于昆虫的神经系统。

3.2　细辛醚的杀虫作用值得进一步研究

细辛醚对昆虫神经系统的作用机制有别于传统的神经毒剂。其对粘虫体内 AChE 和 Na^+，K^+-ATPase 活力均有明显的抑制作用，这两种酶是否为该化合物的作用靶标酶，还有待于通过电生理试验和更为精确的酶学试验来进一步确证。此外，细辛醚对昆虫的致毒症状类似于神经毒剂，但与兴奋性神经毒剂的致毒症状又有所不同。用拟除虫菊酯、有机磷及烟碱类神经毒剂处理粘虫后，几分钟内试虫便表现出极度兴奋、强烈痉挛的症状，并很快进入麻痹期（马志卿，2002）；而经细辛醚处理后的试虫兴奋、痉挛期相对较长，在中毒后期肠内出现空腔现象，这是目前神经毒剂所不具备的致毒症状。症状是机理的外在反映，可见，细辛醚的杀虫作用机理可能较为复杂，尚有待进一步深入研究。

参考文献（References）

Bizzo HR，Daíse L，Abdala RV，2001. Sarisan from leaves of *Piper affinis hispidinervum* C. DC（long pepper）. *Flavour and Fragrance Journal*，16(2)：113－115.

Bradford MM，1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*，72：248－254.

Chen HF，2001. Botanical Active Components Dictionary. Vol. 2. Beijing：China Medicament Sci-Tech Press. 51－52.［陈蕙芳，2001. 植物活性成分辞典. 第2册. 北京：中国医药科技出版社. 51－52］

Chiu SF，1993. Principles of Insect Toxicology. Guangzhou：Guangdong Science & Technology Press.［赵善欢，1993. 昆虫毒理学原理. 广州：广东科技出版社］

Duggan DE，Noll RM，1965. Effects of ethacrynic acid and cardiac glycosides upon a membrane adenosine triphosphatese of renal cortex. *Arch. Biochem. Biophys.*，109：388－396.

Ellman GL，1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*，7：88－95.

Haredi F，1964. Die Eingeborenen-Heilpflanzen des Ulanga-Distriktes Tanganjikas（Ostafrika）. In：Acta Tropica，Suppl. 8［Afrikanische Heilpflanzen /Plantes médicinales Africaines］，Verlag für Recht and Gesellschaft，Basel.

Lees GJ，1991. Inhibition of sodium-potassium-ATPase：a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. *Brain Res. Rev.*，16(3)：283－300.

Ma ZQ，2002. Studies on the Relationship between the Symptoms and Mechanism of Different Kinds of Insecticides. PhD Dissertation，Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry，Yangling，Shaanxi.［马志卿，2002. 不同类杀虫药剂的致毒症状与作用机理关系研究. 西北农林科技大学博士学位论文，陕西杨凌］

Masuda T，Inazumi A，Yamada Y，Padolina WG，Kikuzaki H，Nakatani N，1991. Antimicrobial phenylpropanoids from *Piper sarmentosum*. *Phytochemistry*，30：3 227－3 228.

Turner PB，1977. Analytical Biochemistry of Insects. New York：Elsevier Scientific Publishing Company.

Villegas M，Vargas D，Msonthi JD，Marston A，Hostettmann K，1988. Isolation of the antifungal compounds falcarindiol and sarisan from *Heteromaorpha trifoliate*. *Planta Medica*，54(1)：36－37.

Wan CX，2003. Insecticidal and Antifungal Activities of *Ligusticum sinense* Oliv. MSc Dissertation，Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry，Yangling，Shaanxi.［万传星，2003. 藁本杀虫抑菌作用初步研究. 西北农林科技大学硕士学位论文，陕西杨凌］

Zhang J，2005. Insecticidal Activity and Mechanism of Sarisan. MSc Dissertation，Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry，Yangling，Shaanxi.［张静，2005. 细辛醚杀虫作用初步研究. 西北农林科技大学硕士学位论文，陕西杨凌］

Zhang J，Ma ZQ，Feng JT，Feng G，Zhang X，2005. Bioactivity of sarisan against *Musca domestica* L. and *Culex pipiens pallens*. *Chinese Journal of Pesticides Science*，7(1)：85－87.［张静，马志卿，冯俊涛，冯岗，张兴，2005. 细辛醚对家蝇和淡色库蚊的生物活性. 农药学学报，7(1)：85－87］

（责任编辑：黄玲巧）